

NEW ANTITUMOR SUBSTANCE, FUNGUS FOR PRODUCING THE SUBSTANCE, CELL CYCLE INHIBITOR AND ANTITUMOR AGENT COMPRISING THE SUBSTANCE AS ACTIVE INGREDIENT

Patent Number: JP10130266

Publication date: 1998-05-19

Inventor(s): FUKUMOTO KENJI; ASARI TORU; HARADA TAKEO; KONO SHINKICHI; KANO KANEO; KAWASHIMA HIROSHI; SEKIYA HIROKATSU; OMIZO KAZUNORI

Applicant(s): NIPPON STEEL CORP.; NIPPON STEEL CHEM CO LTD

Requested Patent:  JP10130266

Application Number: JP19970188749 19970714

Priority Number (s):

IPC Classification: C07D403/06; A61K31/505; A61K35/74; C07G17/00; C12N1/14; C12P1/02; C12P17/16

EC Classification:

Equivalents: JP3131574B2

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new substance having animal cell specific proliferation inhibiting activity and cell circle inhibiting activity, by culturing a fungus belonging to the genus *Aspergillus*.

SOLUTION: This substance has the following physical and chemical properties. Molecular weight: 350. Molecular formula: C₂₀ H₂₂ N₂₂ O₂. Infrared absorption spectrum: as shown by the figure. <1> H-Nuclear magnetic resonance: δ (ppm) 1.47(6H, s), 2.94(1H, dd, J=14, 10Hz), etc. <13> C-Nuclear magnetic resonance: δ (ppm), 28.07(CH₃), 28.07(CH₃), etc. <15> N-Nuclear magnetic resonance: δ (ppm), 112, 134, 161, 253. The maximum absorption value of ultraviolet light spectrum in methanol has a peak at 230nm under a neutral condition at 323nm. Being excited under a neutral condition in methanol by an ultraviolet light at 320-340nm, having the maximum value at 395-400nm and emitting fluorescence having 350-550nm wavelength width. Soluble in ethyl acetate, etc., slightly soluble in water, benzene, etc. Negative in ninhydrin reaction and positive in color reaction, in orange with nitrous acid. Color: white. Shown by the formula, produced by *Aspergillus ustus* (FERM P-15829).

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-130266

(43) 公開日 平成10年(1998) 5月19日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 0 7 D 403/06	2 3 3	C 0 7 D 403/06	2 3 3
A 6 1 K 31/505		A 6 1 K 31/505	
35/74	ADU	35/74	ADUG
C 0 7 G 17/00		C 0 7 G 17/00	C
C 1 2 N 1/14		C 1 2 N 1/14	A
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 14 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平9-188749	(71) 出願人	000006655 新日本製鐵株式会社 東京都千代田区大手町 2 丁目 6 番 3 号
(22) 出願日	平成 9 年(1997) 7 月 14 日	(71) 出願人	000006644 新日鐵化学株式会社 東京都中央区新川二丁目 31 番 1 号
(31) 優先権主張番号	特願平8-234477	(72) 発明者	福元 研治 神奈川県川崎市中原区井田 3-35-1 新 日本製鐵株式会社技術開発本部内
(32) 優先日	平 8 (1996) 9 月 4 日	(72) 発明者	浅利 徹 神奈川県川崎市中原区井田 3-35-1 新 日本製鐵株式会社技術開発本部内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外 2 名) 最終頁に続く

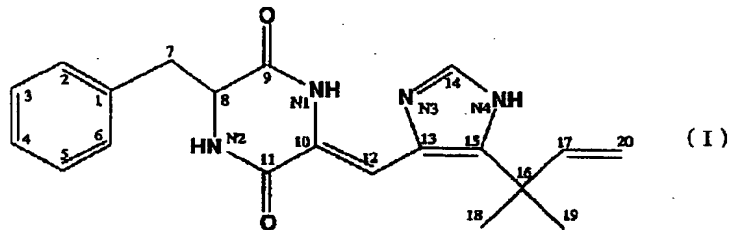
(54) 【発明の名称】 新規抗腫瘍物質、該物質を製造するための微生物及び方法、並びに該物質を有効成分とする細胞周期阻害剤及び抗腫瘍剤

(57) 【要約】

【解決手段】 分子式 $C_{20}H_{22}N_4O_2$ で表される動物細胞特異的な高い増殖阻害活性を有する新規抗腫瘍物質 NSC

L-96F037、次式 (I) :

【化 1】



で示される化合物又はその薬学的に許容される塩、及びそれらの製造方法、前記化合物を生産する能力を有するアスペルギルス・ウスツス (*Aspergillus ustus*)、並びに前記化合物を有効成分とする細胞周期阻害剤及び抗腫

瘍剤。

【効果】 本発明の化合物は、動物細胞特異的な高い増殖阻害活性、及び細胞周期阻害活性を有するので、細胞周期阻害剤及び抗腫瘍剤として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の理化学的性質を有する抗腫瘍物質N SCL-96F037。

(i) 分子量: 350 (FABMS M/Z 351 (M+H))

(ii) 分子式: $C_{20}H_{22}N_4O_2$

(iii) 赤外線吸収スペクトル: 図1のとおり

(iv) 1H -核磁気共鳴スペクトル (500MHz、 $CDCl_3$ 中で測定、内部標準として $CHCl_3$ の化学シフト値を7.24ppmとした。) : δ (ppm)

1.47(6H, s), 2.94(1H, dd, J=14, 10Hz), 3.45(1H, dd, J=14, 4 Hz), 4.33(1H, brd, J=10Hz), 5.10(1H, d, J=17Hz), 5.14(1H, d, J=11Hz), 5.88(1H, br), 6.00(1H, dd, J=17, 11Hz), 6.86(1 H, s), 7.21-7.26(3H, m), 7.31(2H, t, J=8Hz), 7.53(1H, s), 9.61(1H, br), 12.08(1H, br)

(v) ^{13}C -核磁気共鳴スペクトル (400MHz、 $CDCl_3$ 中で測定、内部標準として $CDCl_3$ の化学シフト値を77.10ppmとした。) : δ (ppm)

28.07(CH_3), 28.07(CH_3), 37.69(C), 41.33(CH_2), 57.24(C H), 105.67(CH), 113.46(CH_2), 123.77(CH), 127.56(CH), 12

9.18(CH), 129.18(CH), 129.62(CH), 129.62(CH), 132.29 (C), 132.64(C), 135.55(C), 136.88(C), 144.75(CH), 160.0 4(C), 164.85(C)

(vi) ^{15}N -核磁気共鳴スペクトル (600MHz、 $CDCl_3$ 中で測定、内部標準としてアンモニアの化学シフト値を0 ppmとした。) : δ (ppm)

112, 134, 161, 253

(vii) メタノール中での紫外スペクトルの吸収極大値は、中性条件下で323nmで、230nmにピークを持つ。

(viii) 中性条件下、メタノール中で、320 ~ 340nmの紫外線によって励起され、395 ~ 400nmに極大値を持ち、350 ~ 550nmの波長幅を持つ蛍光を発する。

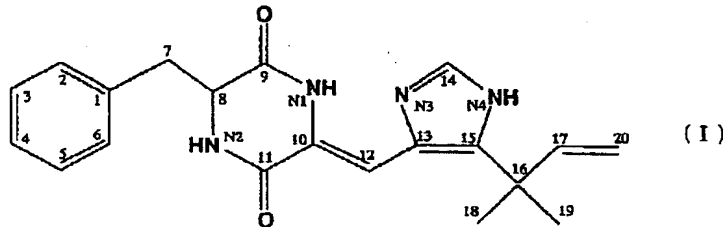
(ix) 酢酸エチル、クロロホルム、メタノール、ピリジンに可溶、水、ベンゼン、トルエンに難溶

(x) ニンヒドリン反応陰性、亜硝酸イオンとの呈色反応陽性 (橙色)

(xi) 物質の色: 白色

【請求項2】 次式 (I) :

【化1】



で示される化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項3】 請求項1又は2記載の化合物を生産する能力を有するアスペルギルス・ウスツス (*Aspergillus ustus*) 。

【請求項4】 直径18mm、長さ180mmの試験管1本あたり、生産培地 (生産培地: グルコース5g/l、グリセリン20ml/l、綿実かす20g/l、酵母エキストラクト2g/l、塩化ナトリウム2.5g/l、炭酸カルシウム4g/l (pH6.5)) 5mlを入れて準備した試験管各々に、該菌株の分生子を滅菌水で懸濁させて調製した菌懸濁液を50 μ 接種し、27℃、往復振盪 (260rpm) で5日間培養せしめ、該培養液に試験管1本あたり10mlのアセトンを添加し、室温で1日間抽出後、濾過によって不溶物を除去した濾液を減圧濃縮し、アセトンを留去した残水層に酢酸エチル5mlを3回添加、抽出し、減圧濃縮乾固したものをメタノールに溶解させて調製したものについて、標準として純粋な請求項1又は2記載の化合物を用いて、高速液体クロマトグラフィーにより測定した場合に、生産培地1L当たり、2mg以上の量で請求項1又は2記載の化合物を生産する請求項3記載のアスペルギルス・ウスツス (*Aspergillus ustus*) 。

【請求項5】 アスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属し、請求項1又は2記載の化合物を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、その培養物から該化合物を採

取することを特徴とする請求項1又は2記載の化合物の製造方法。

【請求項6】 請求項1又は2記載の化合物を有効成分として含有する細胞周期阻害剤。

【請求項7】 請求項1又は2記載の化合物を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、新規抗腫瘍物質、該物質を製造するための微生物及び方法、並びに該物質を有効成分とする細胞周期阻害剤及び抗腫瘍剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、微生物代謝産物から単離精製された抗腫瘍物質としては、DNAと結合することによって抗腫瘍活性を示すアントラサイクリン類、マイトマイシン類等の抗腫瘍抗生物質が知られており、実際に抗腫瘍剤として用いられてきた (上野芳夫、大村智編: 微生物薬品化学 (改訂第二版)、南江堂 (1986年))。また作用機序を異にする微生物代謝産物から単離精製された抗腫瘍物質としては、トリコスタチンA、リゾキシシン、グリセオフルビン等が知られている (吉田稔、別府輝彦: 蛋白質核酸酵素、第38巻11号、1753頁 (1993年)、岩崎成夫: 化学と生物、第32巻3

号、153頁(1994年))。しかし、更に高い抗腫瘍性と、選択性の観点から、特に動物細胞特異的な増殖阻害活性を備える微生物代謝産物由来の新規な化合物が求められている。

【0003】一方、人体を構成する細胞は恒常性を維持するためにその増殖と分化は厳密に制御されている。細胞は、M期・G1期・S期・G2期という一連の過程からなる細胞周期を回転することにより分裂、増殖を行う。この細胞周期の制御機構に異常が生じると癌や免疫疾患になる。最近では、細胞周期の調節機構が分子レベルで解明されつつあり、細胞周期を調節する物質には、抗腫瘍剤、免疫抑制剤の可能性が知られている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、動物細胞特異的な増殖阻害活性、及び細胞周期阻害活性を備える新規な抗腫瘍物質、該物質を製造するための微生物及び方法、並びに該物質を有効成分とする細胞周期阻害剤及び抗腫瘍剤を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記目的を達成すべく鋭意努力した結果、アスペルギルス(*Aspergillus*)属に属する微生物の培養物中に新規抗腫瘍物質が生産され、これが動物細胞特異的な増殖阻害活性、及び細胞周期阻害活性を有することを見出し、この物質をNSCL-96F037と命名した。

【0006】即ち、本発明は、下記の理化学的性質を有する抗腫瘍物質NSCL-96F037を提供するものである。

(i) 分子量: 350 (FAB/MS M/Z 351 (M+H))

(ii) 分子式: $C_{20}H_{22}N_4O_2$

(iii) 赤外線吸収スペクトル: 図1のとおり

(iv) 1H -核磁気共鳴スペクトル(図2参照)(500MHz, $CDCl_3$ 中で測定、内部標準として $CHCl_3$ の化学シフト値を7.24ppmとした。): δ (ppm)

1.47(6H, s), 2.94(1H, dd, J=14, 10Hz), 3.45(1H, dd, J=14, 4Hz), 4.33(1H, brd, J=10Hz), 5.10(1H, d, J=17Hz), 5.14(1H,

d, J=11Hz), 5.88(1H, br), 6.00(1H, dd, J=17, 11Hz), 6.86(1H, s), 7.21-7.26(3H, m), 7.31(2H, t, J=8Hz), 7.53(1H, s), 9.61(1H, br), 12.08(1H, br)

【0007】(v) ^{13}C -核磁気共鳴スペクトル(図3参照)(400MHz, $CDCl_3$ 中で測定、内部標準として $CDCl_3$ の化学シフト値を77.10ppmとした。): δ (ppm)

28.07(CH_3), 28.07(CH_3), 37.69(C), 41.33(CH_2), 57.24(C), 105.67(CH), 113.46(CH_2), 123.77(CH), 127.56(C), 129.18(CH), 129.18(CH), 129.62(CH), 129.62(CH), 132.29(C), 132.64(C), 135.55(C), 136.88(C), 144.75(CH), 160.04(C), 164.85(C)

【0008】(vi) ^{15}N -核磁気共鳴スペクトル(600MHz, $CDCl_3$ 中で測定、内部標準としてアンモニアの化学シフト値を0ppmとした。): δ (ppm)

112, 134, 161, 253

(vii) メタノール中での紫外スペクトルの吸収極大値は、中性条件下で323nmで、230nmにピークを持つ(図4参照)。

【0009】(viii) 中性条件下、メタノール中で、320~340nmの紫外線によって励起され、395~400nmに極大値を持ち、350~550nmの波長幅を持つ蛍光を発する。

(ix) 酢酸エチル、クロロホルム、メタノール、ピリジンに可溶、水、ベンゼン、トルエンに難溶

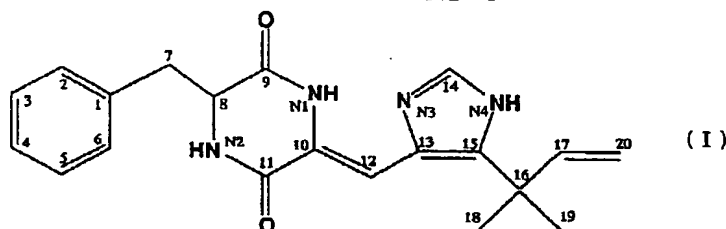
(x) ニンヒドリン反応陰性、亜硝酸イオンとの呈色反応陽性(橙色)

(xi) 物質の色: 白色

また、本発明者らは、前記理化学的性質を有する抗腫瘍物質の構造解析を行った結果、次式(I):

【0010】

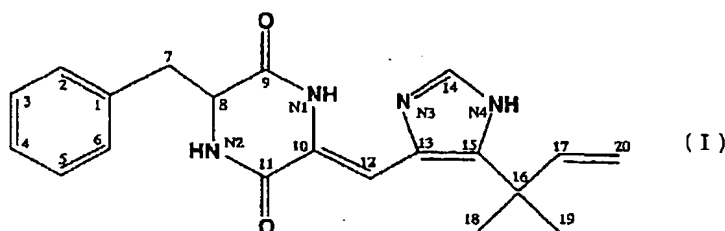
【化2】



【0011】で示される化合物であることが判明した。従って、本発明は、更に、次式(I):

【0012】

【化3】



【0013】で示される化合物又はその薬学的に許容される塩を提供するものである。また、本発明は、抗腫瘍物質NSCL-96F037又は前記式(I)で示される化合物を生産する能力を有するアスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*)、好ましくは、直径18mm、長さ180mmの試験管1本あたり、生産培地(生産培地: グルコース5g/l、グリセリン20ml/l、綿実かす20g/l、酵母エキストラクト2g/l、塩化ナトリウム2.5g/l、炭酸カルシウム4g/l (pH6.5)) 5mlを入れて準備した試験管各々に、該菌株の分生子を滅菌水で懸濁させて調製した菌懸濁液を50 μ 接種し、27℃、往復振盪(260rpm)で5日間培養せしめ、該培養液に試験管1本あたり10mlのアセトンを添加し、室温で1日間抽出後、濾過によって不溶物を除去した濾液を減圧濃縮し、アセトンを留去した残水層に酢酸エチル5mlを3回添加、抽出し、減圧濃縮乾固したものをメタノールに溶解させて調製したもののについて、標準として純粋な抗腫瘍物質NSCL-96F037又は前記式(I)で示される化合物を用いて、高速液体クロマトグラフィーにより測定した場合に、生産培地1L当たり、2mg以上、好ましくは8mg以上の量で抗腫瘍物質NSCL-96F037又は前記式(I)で示される化合物を生産するアスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*)、並びにアスペルギルス(*Aspergillus*) 属に属し、抗腫瘍物質NSCL-96F037又は前記式(I)で示される化合物を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、その培養物から該化合物を採取することを特徴とする抗腫瘍物質NSCL-96F037又は前記式(I)で示される化合物の製造方法を提供するものである。更に本発明は、抗腫瘍物質NSCL-96F037又は前記式(I)で示される化合物を有効成分として含有する細胞周期阻害剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明の抗腫瘍物質NSCL-96F037又は前記式(I)で示される化合物を生産する微生物としては、抗腫瘍物質NSCL-96F037又は前記式(I)で示される化合物を生産する能力を有するアスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*)であれば特に制限はないが、好ましい具体例としては、神奈川県川崎市の土壌から分離されたアスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*) NSC-F037及びアスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*) NSC-F038が挙げられる。また、本発明の微生物は、抗腫瘍

物質NSCL-96F037又は前記式(I)で示される化合物を生産する能力を有するアスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*)を、エチルメタンスルホネート、紫外線照射、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン等の変異原で処理した変異株も包含する。

【0015】アスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*) NSC-F037及びアスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*) NSC-F038は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に平成8年9月3日付けで寄託され、それぞれFERM P-15829及びFERM P-15830の受託番号が付されている。

【0016】アスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*) NSC-F037及びアスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*) NSC-F038は、いずれも次の菌学的性質を有する。

(1) 各種培地における生育形態

ツァベック酵母エキス寒天培地(25℃)での生育は、速く、7日間で45~46mmである。ツァベック酵母エキス寒天培地(37℃)での生育は、それよりやや遅く、7日間で39~41mmである。麦芽エキス寒天培地での集落表面の色調は灰色、裏面は灰緑色である。

【0017】(2) 形態的性状

ツァベック寒天培地上での形態的性状を示す。

分生子頭: 放射状

分生子柄: 滑面、褐色で長さ100~350 μ m、直径4~7 μ m

頂のう: 球形~フラスコ形で、直径11~15 μ m、上部2/3~1/2よりメトレを形成

メトレ: 5~7 \times 4~7 μ m

フィアライド: アンブル形で、5~8 \times 3~4 μ m

分生子: 褐色で、球形、壁面は粗面、3 \times 5 μ m

【0018】以上の菌学的性質より、ザ・ジーナス・アスペルギルス(K.B. Raper and D.I. Fennel, "The genus *Aspergillus*", Williams and Wilkins (1965))に従い、不完全菌亜門、線菌目、アスペルギルス(*Aspergillus*) 属ウスツス(*ustus*) 種に属することが明らかとなり、本菌株をアスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*) NSC-F037及びアスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*) NSC-F038と命名した。

【0019】アスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*)に属する公知の菌株には、抗腫瘍物質NSCL-

96F037又は前記式(I)で示される化合物を生産する能力を有するものではなく、アスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*) NSC-F037及びアスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*) NSC-F038は、いずれも新菌株であると結論した。

【0020】なお、アスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*) NSC-F038は、アスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*) NSC-F037の約4倍の抗腫瘍物質NSCL-96F037又は前記式(I)で示される化合物の生産能を有する。

【0021】アスペルギルス(*Aspergillus*) 属に属し、抗腫瘍物質NSCL-96F037又は前記式(I)で示される化合物を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、その培養物から該化合物を採取することにより、本発明の抗腫瘍物質NSCL-96F037又は前記式(I)で示される化合物を製造することができる。前記微生物は、常法に従って培養することができ、培養の形態は、液体培養でも固体培養でもよいが、工業的に有利に培養するためには、前記微生物の菌懸濁液を液体培地に接種し、通気攪拌培養を行えばよい。培地の栄養源としては特に限定されることはないが、微生物の培養に通常用いられる炭素源、窒素源、その他の培地成分を含有させることができる。炭素源としては、デンプン、グリセリン、グルコース、シュクロース、ガラクトース等が、窒素源としては、ペプトン、大豆粉、肉エキース、コーンステイープリカー、綿実かす、アンモニウム塩、硝酸塩、その他有機又は無機の窒素化合物が用いられる。その他、無機塩、微量栄養源を適宜添加してもよい。培養温度、培養時間等の培養条件は、使用する菌の発育に適し、しかもNSCL-96F037又は前記式(I)で示される化合物の生産が最高となるような条件を選ぶことが好ましい。例えば、培地のpHは、4~9が適当であり、5~8が好ましく、培養温度は、15~35℃が適当であり、23~28℃が好ましい。培養時間は、48~192時間が適当であり、72~192時間が好ましい。しかし、これらの培地組成、培地のpH、培養温度、培養時間等の培養条件は使用する菌株の種類や、外部の条件等に応じて、所望の結果が得られるように適宜調整されるべきことはいうまでもない。前記のような培養物から、代謝産物を採取するのに通常使用される手段を適宜用いてNSCL-96F037又は前記式(I)で示される化合物を採取することができる。例えば、NSCL-96F037又は前記式(I)で示される化合物と培養物中に含まれる他の物質との有機溶媒に対する親和性の差を利用する手段、溶解度の差を利用する手段、各種樹脂に対する吸着親和力の差を利用する手段のいずれかを、それぞれ単独で、又は適宜組み合わせ、あるいは反復して使用することができる。具体的には、イオン交換クロマトグラフィー、非イオン性吸着樹脂を用いたクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラ

フィー、活性炭、アルミナ、シリカゲル等の吸着剤によるクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等の各種の液体クロマトグラフィー、あるいは、結晶化、減圧濃縮、凍結乾燥等の手段を、それぞれ単独で、又は適宜組み合わせ、あるいは反復して使用することができる。

【0022】前記のようにして得られたNSCL-96F037の理化学的性質は前記のとおりであり、新規化合物であることが明らかになった。本発明の抗腫瘍物質NSCL-96F037及び前記式(I)で示される化合物は、塩基性物質であり、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、酢酸塩、メタンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、クエン酸塩等の薬学的に許容される塩として用いることもできる。

【0023】本発明の抗腫瘍物質NSCL-96F037及び前記式(I)で示される化合物は、動物細胞特異的な高い増殖阻害活性、及び細胞周期阻害活性を有し、細胞周期阻害剤及び抗腫瘍剤として有用である。

【0024】本発明の抗腫瘍物質NSCL-96F037又は前記式(I)で示される化合物を有効成分として含有する細胞周期阻害剤及び抗腫瘍剤は、経口及び非経口投与のいずれの投与経路でも使用可能であり、経口投与する場合は、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等の剤形で投与することができ、また、非経口投与する場合は、水溶性懸濁液、油性製剤等の皮下あるいは静脈注射剤、点滴剤、坐薬、塗布薬、軟膏のような剤形で投与することができる。

【0025】本発明の抗腫瘍物質NSCL-96F037又は前記式(I)で示される化合物を細胞周期阻害剤又は抗腫瘍剤として製剤化するために、界面活性剤、賦形剤、滑沢剤、佐剤及び薬学的に許容される被膜形成物質、コーティング助剤等を適宜使用することができる。例えば、界面活性剤としては、アルコール類、エステル類、硫酸化脂肪族アルコール類等を挙げることができる。また、賦形剤としては、ショ糖、乳糖、デンプン、結晶セルロース、マンニット、軽質無水ケイ酸、アルミン酸マグネシウム、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、合成ケイ酸アルミニウム、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、リン酸水素カルシウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム等を挙げることができる。滑沢剤としては、ステアリン酸マグネシウム、タルク、硬化油等を挙げることができ、懸濁剤や潤滑剤のごとき佐剤としては、ココナッツ油、オリーブ油、ゴマ油、落花生油、大豆リン脂質等を挙げることができる。被膜形成物質としては、セルロースや糖類等の炭水化物の誘導体として、酢酸フタル酸セルロース、また、ポリビニル誘導体としてアクリル酸メチル・メタクリル酸共重合体が挙げられる。コーティング助剤としては、フタル酸エステル類等の可塑剤を挙げることができる。前記の成分の他に、甘味料、香料、着色料、保存料等を添加してもよ

い。

【0026】本発明の細胞周期阻害剤及び抗腫瘍剤は、成人の患者に対して、有効成分であるNSCL-96F037又は前記式(1)で示される化合物として0.1mg〜1g/日を1回又は数回に分けて経口又は非経口投与する。この投与量は、病状、患者の年齢、体重により適宜増減することができる。

【0027】また、本発明の細胞周期阻害剤を生化学試験用試薬として使用する場合、有機溶媒又は含水有機溶媒に溶解して各種培養細胞系へ直接適用すると、細胞周期の進行をG2/M期で阻止する。使用可能な有機溶媒としては、例えば、メタノールやジメチルスルホキシド等を挙げることができる。剤形としては、例えば、粉末もしくは顆粒等の固形剤又は有機溶媒もしくは含水有機溶媒に溶解した液剤等を挙げることができる。通常、本発明の細胞周期阻害剤の効果的な使用量範囲は1〜100μg/mlであるが、適切な使用量は培養細胞系の種類や使用目的により異なる。また、必要により前記の範囲外の量を用いることもできる。

【0028】

【実施例】以下、実施例及び試験例により、本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらにより何ら制限されるものではない。

【0029】(実施例1) NSC-F037株からのNSCL-96F037の製造

種菌としてアスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*) NSC-F037を用いた。直径18mm、長さ180mmの試験管1本あたり滅菌済生産培地(生産培地: グルコース5g/l、グリセリン20ml/l、綿実かす20g/l、酵母エキストラクト2g/l、塩化ナトリウム2.5g/l、炭酸カルシウム4g/l (pH6.5)) 5mlを入れて準備した試験管1700本(生産培地計8.5L)各々に、該菌株の分生子を滅菌水で懸濁させて調製した菌懸濁液を50μl接種し、27℃、往復振盪(260rpm)で5日間培養した。該培養液に試験管1本あたり10mlのアセトンを添加し、室温で1日間抽出した。ついで、汙過によって不溶物を除去した汙液(20L)を減圧濃縮し、アセトンを留去した。残った水層に酢酸エチル9Lを添加し抽出した。酢酸エチル層を硫酸ナトリウムで脱水、減圧濃縮乾固後、シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー(クロロホルム-メタノール系)に供し、抗腫瘍活性画分を分取した。本画分を減圧濃縮乾固後、少量の70%メタノールに溶解させ、センシュバックODS-5251-SS 20mmφ×250mm(株)センシュバ科学)を用いる高速液体クロマトグラフィーにより、70%メタノールのイソクラティック条件で精製し、抗腫瘍活性画分を分取した。更に、本画分を減圧濃縮乾固後、センシュバック アクアシルSS-5251(60) 20mmφ×250mm(株)センシュバ科学)を用いる高速液体クロマトグラフィーにより、クロロホルム:メタノール=95:5のイソクラティック条件で精製し、抗腫瘍活性画分を分取した。本画分を減圧濃縮し、透明な油状物質を得た。これを少量のベンゼンにて懸濁させ、減圧濃縮乾固することにより、25mgのNSCL-96F037を白色粉末として得た。

【0030】(実施例2) NSC-F038株からのNSCL-96F037の製造

アスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*) NSC-F037の代わりにアスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*) NSC-F038を用いる以外は、実施例1と同様に処理した結果、アスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*) NSC-F038は、アスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*) NSC-F037の約4倍の抗腫瘍物質NSCL-96F037生産能を有することが判明した。結果を表1に示す。

【0031】

【表1】

菌 株	比 生 産 能
NSC-F037	1 (2.9mg/1培地)
NSC-F038	4 (11.8mg/1培地)

【0032】(実施例3) NSC-F038株からの本発明化合物(1)の製造

グルコース0.5%、グリセリン2%、酵母エキストラクト0.2%、綿実かす2%、塩化ナトリウム0.25%及び寒天1.5%(pH6.5)からなる固形培地(直径9cmシャーレに20mlの前記培地)にアスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*) NSC-F038を5点接種し26℃で7日間、暗所にて培養し、胞子を形成させた。0.05%の濃度になるようにツウイーン20を加えた滅菌水5mlにて胞子を回収し胞子懸濁液を得た。この胞子懸濁液を前記固形培地20mlを含むシャーレ400枚に0.1mlずつ接種し、26℃で8日間、暗所にて培養を行った。この培養物をミキサーにて破碎し、8Lの酢酸エチルを加え、2日間放置し、抽出した。回収した酢酸エチルを減圧濃縮し、褐色のシロップ15gを得た。

【0033】このシロップを20mlの酢酸エチルに溶解し、酢酸エチルで調製したシリカゲルカラム(ベッド容積:直径8cm、長さ20cm)に浸潤させ、アセトン-酢酸エチル(1:5)にて溶出を行った。溶出液を500mlずつ溶出順に従って分画した。本化合物は5〜10番目の分画に溶出され、この溶出物を減圧濃縮することにより計4.65gの濃茶色粉末を得た。

【0034】この濃茶色粉末を10mlのクロロホルムにて溶解し、クロロホルムで調製したシリカゲルカラム(ベッド容積:直径4cm、長さ30cm)に浸潤させ、最初にクロロホルム500mlで溶出し、次にクロ

ロホルム-メタノール(50:1)にて溶出した。

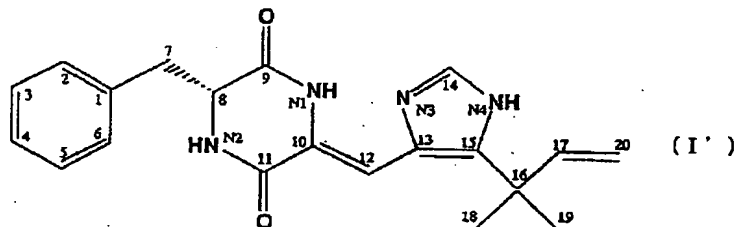
【0035】本化合物は、クロロホルム-メタノール(50:1)溶液にて溶出され、計1.05gの茶色粉末を得た。この茶色粉末に酢酸エチルを加え、よく攪拌し2日間静置することにより、本化合物を含む白色粉末(A)628mgを析出させた。この白色粉末(A)を加水分解し、得られたフェニルアラニン光学活性カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーに付したところ、R体及びS体のフェニルアラニンの存在が確認さ

れ、前記白色粉末(A)は、前記式(I)で示される化合物のR体及びS体の両者を含むことが判明した。

【0036】前記白色粉末(A)を微量のメタノールを含む酢酸エチルにて溶解し、7日間放置した。この結果、淡黄色結晶性固体として前記式(I)で示される化合物のR体、即ち、次式(I'):

【0037】

【化4】



【0038】で示される化合物の精製標品を187mg得た。表2及び表3に精製標品の物性値等を示す。

【0040】

【表3】

【0039】

【表2】

物理化学的諸性質

性状	淡黄色結晶
融点	239~241℃
$[\alpha]_D^{25}$	+275° (c=0.44, MeOH)
分子式	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₂
高分解能質量分析	M ⁺
実験値(m/z)	350.1741
理論値(m/z)	350.1743
UV λ _{max} (MeOH) nm	202 (4.38)
(log e)	233 sh (4.05)
	320 (4.43)
IR ν _{max} (KBr) (cm ⁻¹)	3440, 3240, 1670,
	1640, 1440

500MHz ^1H -NMR及び125MHz ^{13}C -NMRデータ

Atom Number	^{13}C NMR data	^1H NMR data
C-1	135.45 s	-
2, 6	129.52 d	7.25 (2H, d, $J=7\text{ Hz}$)
3, 5	129.07 d	7.33 (2H, t, $J=7\text{ Hz}$)
4	127.45 d	7.27 (1H, t, $J=7\text{ Hz}$)
7	41.23 t	2.95 (1H, dd, $J=14, 10\text{ Hz}$) 3.49 (1H, dd, $J=14, 4\text{ Hz}$) 4.35 (1H, br dd, $J=10, 4, \text{ Hz}$)
8	57.14 d	-
9	164.73 s	-
10	123.64 s	-
11	159.94 s	-
12	105.62 d	6.88 (1H, s)
13	132.18 s	-
14	132.56 d	7.55 (1H, s)
15	136.83 s	-
16	37.61 s	-
17	144.66 d	6.02 (1H, dd, $J=18, 11\text{ Hz}$)
18, 19	27.97 q	1.49 (6H, s)
20	113.29 t	5.13 (1H, d, $J=18\text{ Hz}$) 5.17 (1H, d, $J=11\text{ Hz}$)
N1	-	12.08 (1H, br s)
N2	-	5.82 (1H, br s)
N4	-	9.48 (1H, br s)

【0041】(試験例1)

(A) ヒト肺癌由来A-549細胞に対する抗腫瘍作用
EMEM培地(ニッスイ製薬(株))、10%牛胎児血清の組成からなる培地に 10^5 細胞/mlに調整したヒト肺癌由来A-549細胞を100 μl ずつ96穴マイクロタイタープレートの各穴に分注した。最上段の穴に、実施例1で得たNSCL-96F037のメタノール溶液を添加し、半対数希釈法で検体の希釈、添加を行い、該プレートを炭酸ガス細胞培養器内で、37℃、48時間培養した。これにMTT試薬(3-(4, 5-ジメチル-2-チアゾリル)-2, 5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムブロミド)(1mg/ml・PBS)を10 μl ずつ加え、炭酸ガス細胞培養器内で、37℃、6時間培養し、培地を捨てた後、細胞内に生じたホルマザンの結晶を100 μl /穴のジメチルスルホキシドで溶解した。続いてマイクロプレートリーダーにより、595nmの吸光度を測定した。無処理細胞と既知濃度の検体で処理した細胞の吸光度を比較することにより、細胞の増殖を50%阻害する検体濃度(IC_{50})を算出し、 $\text{IC}_{50} = 0.3\mu\text{g}/\text{ml}$ を得た。

【0042】(B) 抗菌試験

グラム陰性菌として大腸菌JM109株、グラム陽性菌としてBacillus natto菌、カビとしてAspergillus niger IFO 6341株を用いて、ろ紙ディスク寒天平板法

(検体100 μg を直径9mmのろ紙に添加、風乾。細菌は標準寒天培地、カビはポテトデキストロース寒天培地を使用)で抗菌試験を行ったが、抗菌活性は観察されなかった。また、酵母Saccharomyces cerevisiae HF7C株を用いて、液体培地希釈法で抗菌試験を行ったが、抗菌活性は観察されなかった。以上のことより、本発明の抗腫瘍物質NSCL-96F037は、動物細胞特異的な高い増殖阻害活性を有することが分かる。

【0043】(試験例2) 本発明化合物の細胞周期阻害活性

ヒト肺癌由来細胞株A431細胞を用いた。A431細胞は37℃で10%牛胎児血清、1%MEM非必須アミノ酸溶液(シグマM2025)を含むEMEM培地にて5%炭酸ガスと水蒸気を飽和させた培養器内で培養し、対数増殖期にある細胞に実施例3で得た本発明化合物(I')の精製標品を添加して、フローサイトメーターと顕微鏡観察により細胞周期の進行を解析した。結果を表4に示す。

【0044】

【表4】

細胞周期阻害活性

濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	阻害効果
0.5	無
1.0	無
2.0	軽微
4.0	軽微
8.0	有
16.0	有
32.0	有

【0045】阻害効果の判定基準は、以下のとおりである。

有：50%以上の細胞が細胞周期をG2/M期で停止した。

軽微：10%以上50%未満の細胞が細胞周期をG2/M期で停止した。

無：10%未満の細胞が細胞周期をG2/M期で停止した。

表4の結果は本発明の化合物が細胞周期阻害剤として有用であることを示している。

【0046】(試験例3) 本発明化合物の細胞増殖抑制効果

ヒト慢性骨髄性白血病細胞K-562をRPMI1640培地(10%の牛胎児血清を含む)で培養、またヒト外陰部扁平上皮癌細胞A-431をDMEM培地(10%の牛胎児血清を含む)で培養した。これらに一連の希釈系列の実施例3で得た本発明化合物(I')の精製標品を加え、48時間培養した後、MTT試薬を加えて生育を計測した。結果を表5に示す。

【0047】

【表5】

細胞増殖抑制効果(50%生育阻止濃度)

被検細胞	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
ヒト慢性骨髄性白血病細胞K-562	13.3
ヒト外陰部扁平上皮癌細胞A-431	2.9

【0048】表5の結果は本発明の化合物が抗腫瘍剤として有用であることを示している。

(製剤例1) 注射・点滴剤

本発明の化合物10mgを含有するように、粉末ブドウ糖5gを加えてバイアルに無菌的に分配し密封した上、窒素、ヘリウム等の不活性ガスを封入して冷暗所に保存

した。使用前にエタノールに溶解し、0.85%生理食塩水100mlを添加して静脈内注射剤とし、1日10~100mlを症状に応じて静脈内注射又は点滴で投与する。

【0049】(製剤例2) 注射・点滴剤

本発明の化合物2mgを用いて、製剤例1と同様の方法により軽症用静脈内注射剤とし、1日10~100mlを症状に応じて静脈内注射又は点滴で投与する。

(製剤例3) 顆粒剤

本発明の化合物1g、乳糖98g及びヒドロキシプロピルセルロース1gを各々とり、よく混合した後、常法に従って粒状に成形し、これをよく乾燥して篩別してビン、ヒートシール包装等に適した顆粒剤を製造した。1日100~1000mgを症状に応じて経口で投与する。

【0050】

【発明の効果】本発明により、新規抗腫瘍物質及びその製造方法、当該物質を生産する能力を有するアスペルギルス・ウスツス(*Aspergillus ustus*)が提供された。本発明の化合物は、動物細胞特異的な高い増殖阻害活性、及び細胞周期阻害活性を有するので、細胞周期阻害剤及び抗腫瘍剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の抗腫瘍物質NSCL-96F037の赤外線吸収スペクトルを示す図である。

【図2】本発明の抗腫瘍物質NSCL-96F037の¹H-核磁気共鳴スペクトルを示す図である。

【図3】本発明の抗腫瘍物質NSCL-96F037の¹³C-核磁気共鳴スペクトルを示す図である。

【図4】本発明の抗腫瘍物質NSCL-96F037の紫外スペクトルを示す図である。

【図5】実施例3で得た本発明化合物(I')の精製標品のメタノール中の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

【図6】実施例3で得た本発明化合物(I')の精製標品の赤外線吸収スペクトル(KBr)を示す図である。

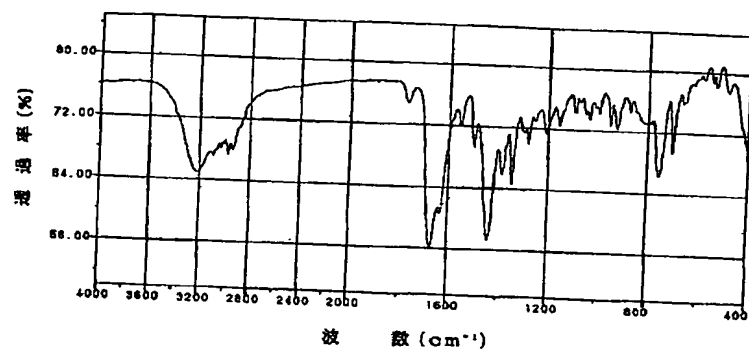
【図7】実施例3で得た本発明化合物(I')の精製標品の¹H-核磁気共鳴スペクトル(CDCl₃)を示す図である。

【図8】実施例3で得た本発明化合物(I')の精製標品の¹³C-核磁気共鳴スペクトル(CDCl₃)を示す図である。

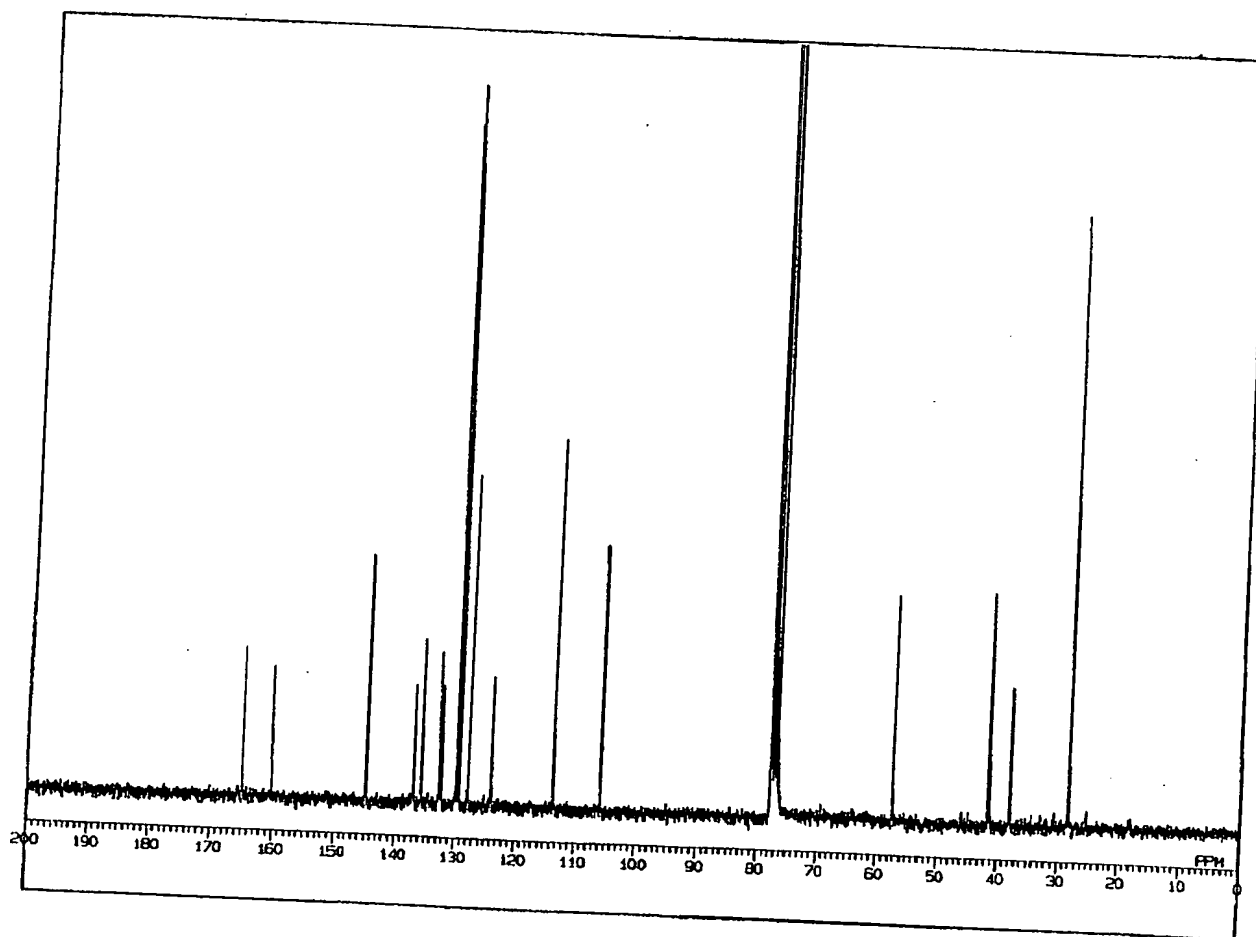
(10)

特開平10-130266

【図1】



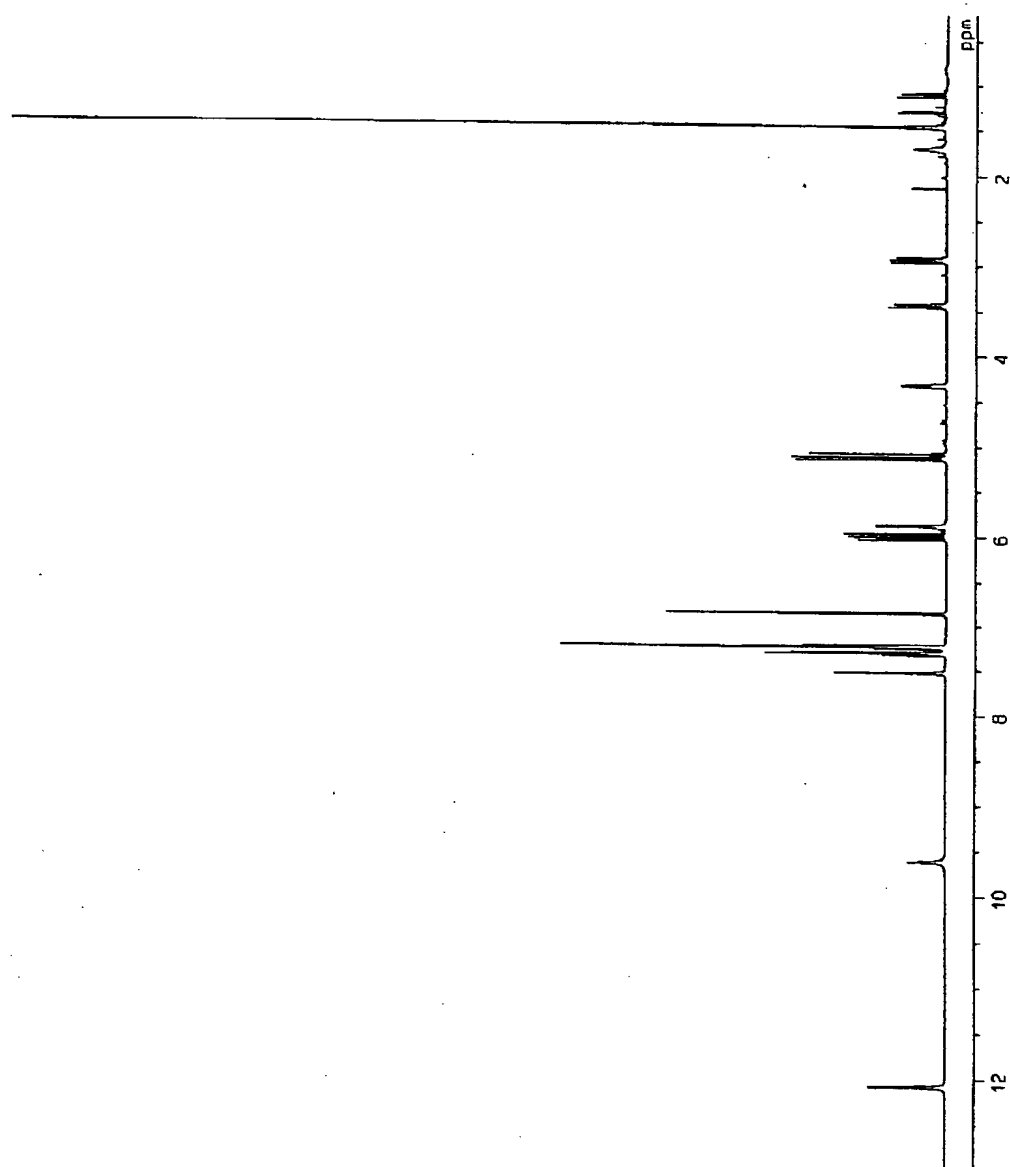
【図3】



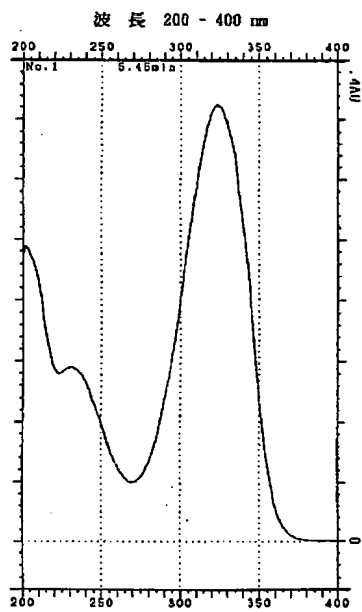
(11)

特開平10-130266

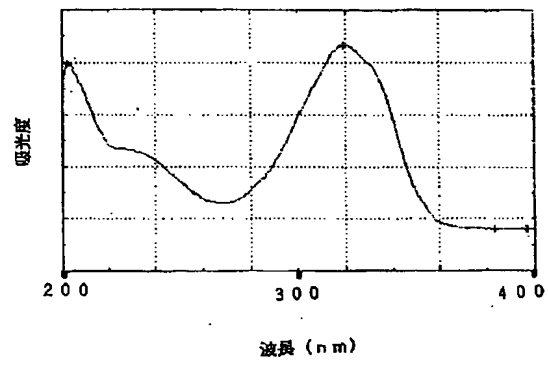
【図2】



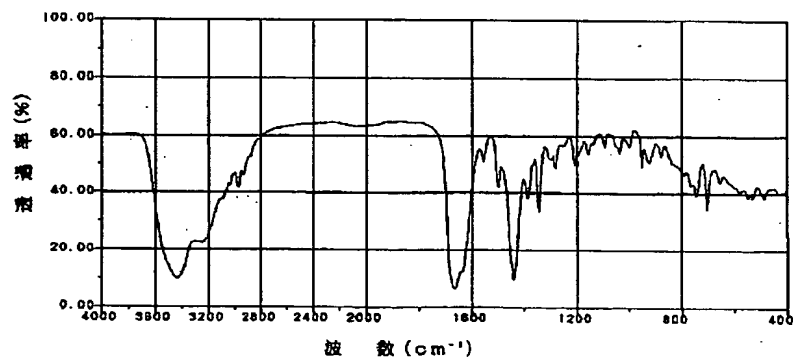
【図4】



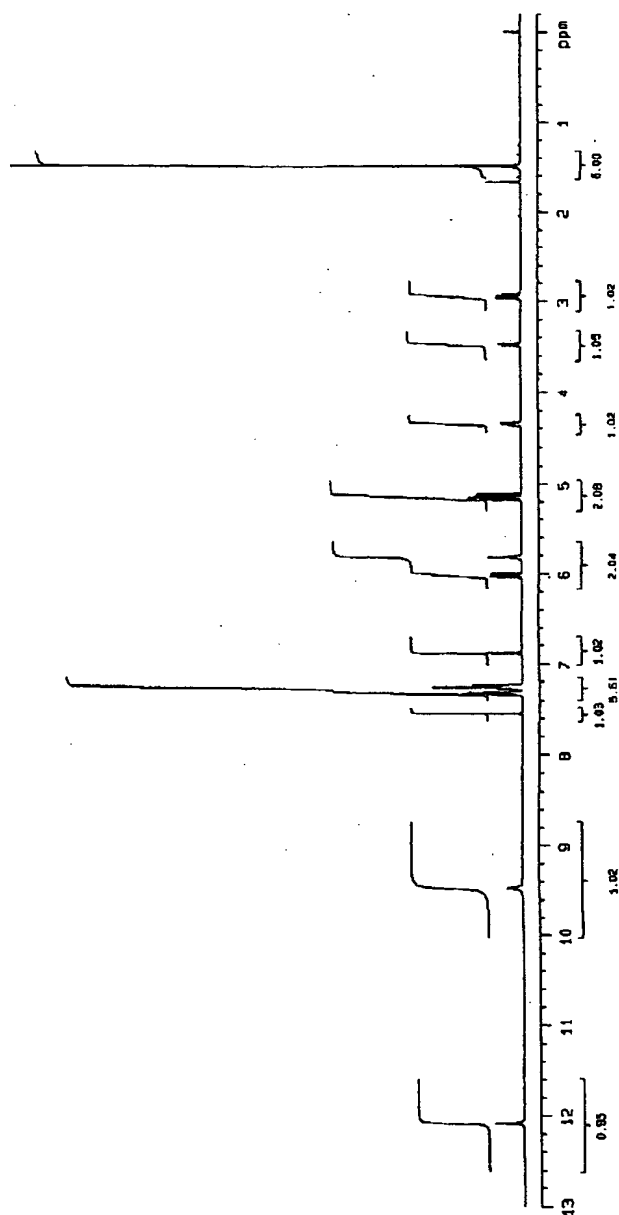
【図5】



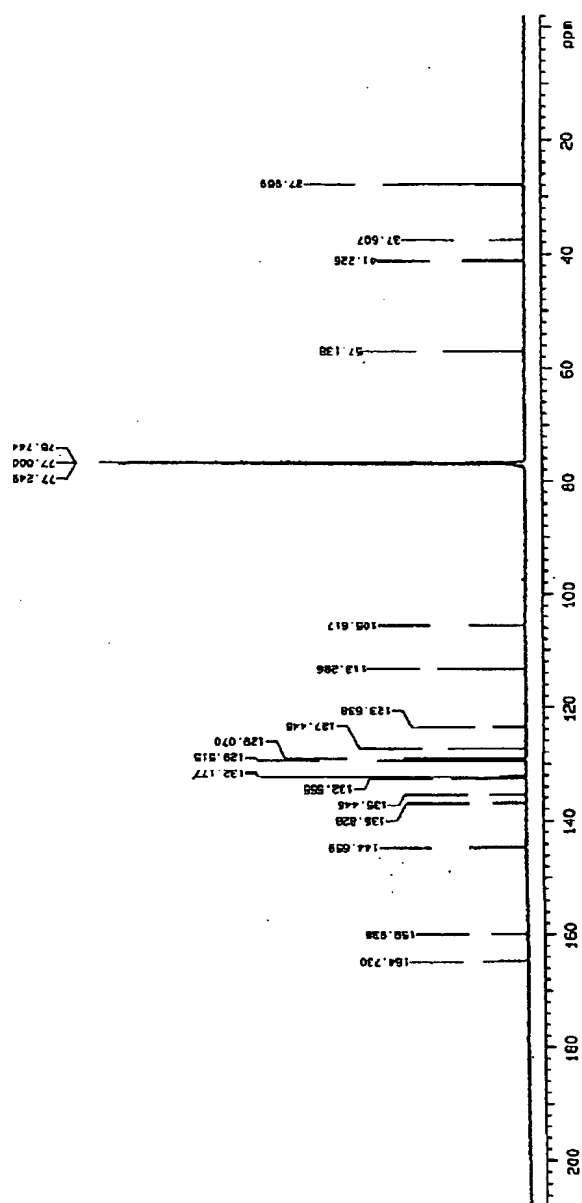
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

C 1 2 P 1/02

17/16

// (C 1 2 N 1/14

C 1 2 R 1:70)

(C 1 2 P 1/02

C 1 2 R 1:70)

識別記号

F I

C 1 2 P 1/02

17/16

Z

(C12P 17/16
C12R 1:70)

(72)発明者 原田 武雄
神奈川県川崎市中原区井田3-35-1 新
日本製鐵株式会社技術開発本部内
(72)発明者 河野 慎吉
神奈川県川崎市中原区井田3-35-1 新
日本製鐵株式会社技術開発本部内
(72)発明者 加納 周雄
神奈川県川崎市中原区井田3-35-1 新
日本製鐵株式会社技術開発本部内

(72)発明者 川島 浩
神奈川県川崎市中原区井田3-35-1 新
日本製鐵株式会社技術開発本部内
(72)発明者 関谷 広勝
神奈川県川崎市中原区井田3-35-1 新
日本製鐵株式会社技術開発本部内
(72)発明者 大溝 和則
神奈川県川崎市中原区井田3-35-1 新
日本製鐵株式会社技術開発本部内